

LETICIA ZEHNDER-ALVES

**Estabelecimento de cultivo da diatomácea *Coscinodiscus wailesii*
Gran & Angst (Bacillariophyta) em meios de cultura com água do
mar enriquecida da Baía de Paranaguá, Paraná**

Monografia apresentada ao Departamento de
Botânica da Universidade Federal do Paraná
como requisito parcial para a obtenção do Título
de Bacharel em Ciências Biológicas.

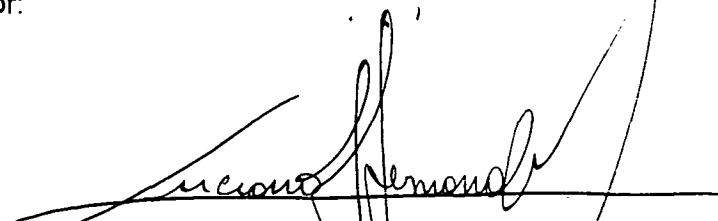
Orientador: Prof. Dr. Luciano F. Fernandes
Co-orientador: MsC. Jackson C. Bassfeld

**Curitiba
-1999-**


LETICIA ZEHNDER-ALVES

**Estabelecimento de cultivo da diatomácea *Coscinodiscus wailesii*
Gran & Angst (Bacillariophyta) em meios de cultura com água do
mar enriquecida da Baía de Paranaguá, Paraná**

Trabalho de Graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas, na Universidade Federal do Paraná. Comissão de avaliação formada por:



Prof. Dr. Luciano Fernandes
Departamento de Botânica, UFPR



MSc. Jackson Bassfeld
Centro de Estudos do Mar, UFPR



Prof. Dr. Frederico Brandini
Centro de Estudos do Mar, UFPR

Curitiba
-1999-

"Os mares são o cinto de segurança da vida neste planeta. A vida nasceu no mar e está umbilicalmente ligada a suas águas".

Jacques-Yves Cousteau

DEDICO
à minha família
José, Renate, Kathyane e Georgia

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luciano Felício Fernandes, pela amizade, orientação, incentivo, explicações e discussões ao longo deste trabalho.

Ao MsC. Jackson César Bassfeld, responsável pelo Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Estudos do Mar, CEPPA, pela acolhida em seu laboratório. Agradeço pela orientação, incentivo, carinho, atenção, explicações e abertura para a utilização dos diversos equipamentos, vidrarias e reagentes, durante todo o tempo de experimentos. E por facilitar minha vida, cuidando de meus experimentos nos momentos em que tive que me ausentar de Pontal do Sul.

Ao Dr. Frederico Pereira Brandini, do Laboratório de Fitoplâncton no CEM, pelos anos de orientação e amizade que me fizeram chegar até aqui, e por disponibilizar os equipamentos necessários para as contagens e análises de clorofila.

À Dra. Daura R. E. Stofella do Centro de Microscopia Eletrônica - UFPR e ao Paulo Brixell (LACTEC - UFPR), pelas sessões de microscopia eletrônica de varredura, que resultaram nas fotomicrografias que ilustram as pranchas deste trabalho.

À Dra. Kátia Regina Vieira de Rezende por toda amizade, apoio, incentivo, carinho, confiança e acolhimento, que fizeram com que os meses de trabalho longe da família fossem menos difíceis.

Ao Ismar, químico do CEM, pela amizade e grande auxílio nas horas de apuro nas análises químicas.

Aos biólogos e amigos Yargos, Ariel, Cassiana, Adriana e Nilva pela coleta de água do mar para a manutenção do cultivo.

À bióloga Fabiana Cunha por me "agüentar" e incentivar meu trabalho nos finais de semana com sua companhia e amizade.

À MsC. Nilva Brandini por me ajudar nos cálculos dos nutrientes e com algumas bibliografias.

Ao Dr. Nelson Takumi Yoneda por fotografar o cultivo em andamento, e empréstimo dos slides.

À Leticia K. Procopiak pela orientação e auxílio na montagem das lâminas permanentes.

Ao Maurício Camargo pelas dicas e assistência quanto ao uso de programas do computador.

Ao MsC. Marcelo Lamour, pelos dados da localização do Canal da Galheta.

À bibliotecária Maria Rosa, pelo auxílio na busca de muitas bibliografias.

Ao Dr. Satoshi Nagai da Universidade Kyoto - Japão, pela gentileza de enviar separatas, e pelas sugestões.

Às meninas Nilva, Gigi e Fabi por tornarem a permanência no alojamento mais aconchegante, e pelas nossas amigáveis conversas noturnas.

Ao Centro de Estudos do Mar - CEM por disponibilizar embarcação para a coleta do fitoplâncton.

Ao Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica - UFPR por disponibilizar equipamentos que foram importantes na preparação das lâminas permanentes e de fotomicrografias em microscópio ótico.

Ao laboratório de Biogeoquímica, pela análise de nutrientes.

À todos com quem convivi, e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

E principalmente à minha família, pelo apoio, amor, dedicação, incentivo durante todos os anos de estudo e muitos meses sem bolsa. À minha mãe, que sempre teve paciência para me ouvir contar sobre o andamento de meus experimentos, mesmo sem, muitas vezes, compreender nada.

Muito obrigada.

Leticia Zehnder-Alves

SUMÁRIO

LISTA DE FOTOS, FIGURAS E TABELAS	viii
RESUMO	ix
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVOS	4
3- MATERIAL e MÉTODOS	5
3.a) Coleta do material em campo	5
3.b) Isolamento e manutenção de culturas estoques	5
3.c) Obtenção das culturas unialgais	6
3.d) Experimentos	6
Série 01	8
Série 02	8
3.e) Preparação do material para taxonomia de <i>Coscinodiscus wailesii</i>	9
4- RESULTADOS	10
4.a) Série 01	10
4.b) Série 02	14
4.c) Descrição de <i>Coscinodiscus wailesii</i>	17
Legenda das pranchas	19
5- DISCUSSÃO	23
5.a) Problemas técnicos durante as séries de experimentos	23
5.b) Série 01	24
5.c) Série 02	26
5.d) Comparação entre as séries de experimentos	27
5.e) Comparando <i>Coscinodiscus wailesii</i> com outras diatomáceas	27
5.f) Observações taxonômicas	29
6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	31
Apêndice I	
a) Fases do cultivo tipo “batch” ou estanque	32
b) Necessidades nutricionais das microalgas	32
Apêndice II	
Composição do meio Guillard F/2	35
Apêndice III	
Esterilização das vidrarias	36
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE FOTOS, FIGURAS E TABELAS

Fotos

1. Vista geral da câmara de cultivo	7
2. Material preparado para retirada de alíquotas	7

Figuras

1. Curvas de crescimento de <i>Coscinodiscus wailesii</i> - série 01.....	12
2. Curvas de crescimento de <i>Coscinodiscus wailesii</i> - série 02	15
3. Curvas de crescimento de <i>Coscinodiscus wailesii</i> - nas duas séries	25

Tabelas

I. Taxas de crescimento e densidades de células - série 01	13
II. Valores de clorofila ($\mu\text{g/l}$) - série 01	13
III. Taxas de crescimento e densidades de células - série 02	16
IV. Dados de concentração média de nutrientes - série 02	17
V. Dados médios da concentração de nutrientes na Baía de Paranaguá	26
VI. Taxas de crescimento de diatomáceas marinhas	28
VII. Constante de meia-saturação de nitrato (K_s) para diatomáceas marinhas com diferentes dimensões	29

Pranchas

I. Fotomicrografias de <i>Coscinodiscus wailesii</i> em MO	20
II. <i>Coscinodiscus wailesii</i> , Baía de Paranaguá, em MEV	21
III. <i>Coscinodiscus wailesii</i> , Baía de Paranaguá, em MEV	22

RESUMO

Células da diatomácea *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyta) coletadas em maio de 1999 no Canal da Galheta (Baía de Paranaguá, Paraná) foram isoladas através de micropipetagem e diluições, obtendo-se culturas unialgais clonais axênicas. As células foram submetidas a cultivos estanques em erlenmeyers de 250 ml de capacidade, contendo 100 ml de meio, e inóculo inicial de 0,5 céls/ml, com temperatura média de 25°C e fotoperíodo de 8:16 (luz:escuro) e mantidas sob agitação contínua. O crescimento das culturas foi monitorado diariamente por contagem celular. Realizou-se duas séries de experimentos, utilizando o meio de cultura semi-definido Guillard F/2 e o meio indefinido, com adição ou exclusão parcial de macronutrientes (nitrato, fosfato e silicato). Determinou-se a taxa máxima de crescimento - μ (div./dia), concentrações de clorofila-a e nutrientes (silicato, fosfato, nitrato e nitrito). O diâmetro das 2809 células medidas durante os experimentos variaram de 306-268 μ m de diâmetro valvar e 197-95 μ m de eixo pervalvar. Na primeira série de experimentos para o meio F/2 completo obteve-se $\mu = 1,27$ e 10,1 céls/ml no terceiro dia experimental. No quinto dia a densidade celular foi de 36,4 céls/ml, taxa de crescimento 1,01 e a concentração de clorofila 96,42 μ g/l. Para o meio F/2 sem adição de silicato obteve-se $\mu = 1,10$ e 10,7 céls/ml no quarto dia. No oitavo dia a densidade foi 45 céls/ml e 45,37 μ g de clorofila/l. O crescimento algal nos outros tratamentos (meio F/2 sem fosfato, sem nitrato e indefinido) foi muito reduzido. Na segunda série de experimentos para o meio F/2 completo obteve-se $\mu = 0,73$ e densidade de 21,9 céls/ml no oitavo dia. No 11º dia a densidade máxima foi 40,3 céls/ml e taxa de crescimento de 0,77. O crescimento algal nos outros tratamentos (indefinido mais silicato, mais fosfato, mais nitrato e meio indefinido) foi reduzido. O padrão geral da análise dos nutrientes mostraram redução nos meios de cultura após o cultivo. Exceto nos meios F/2 completo e no indefinido com nitrato, onde ocorreu um aumento do nitrito, passando de 0,63 μ M para 1,84 μ M e 1,11 μ M para 2,65 μ M, respectivamente. A água utilizada para a preparação dos meios de cultura era rica em silicato, que não foi o fator limitante para o crescimento algal nestas condições. No entanto, nitrato e fosfato foram limitantes, por isso observou-se crescimento apenas discreto nos experimentos quando estes não eram adicionados aos meios de cultura.

1- INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas as florações do plâncton marinho têm preocupado os órgãos governamentais em virtude das consequências negativas que as espécies podem trazer ao ecossistema e à saúde humana, através da produção e liberação de toxinas para o meio ambiente e várias alterações nas cadeias tróficas aquáticas (Hallegraeff, 1993; Hallegraeff *et al.*, 1995). As florações são eventos caracterizados por um crescimento massivo de determinadas microalgas, quando ocorrem simultaneamente condições ótimas de luz, nutrientes e dispersão espacial reduzida, permitindo que as células se acumulem temporariamente (Legendre, 1990; Brandini, 1997). Recentemente, a Comissão Oceanográfica Intergovernamental (COI), órgão da UNESCO, criou o programa Florações Algas Nocivas (HAB - Harmful Algal Blooms) com o objetivo de estudar os fatores que desencadeiam os fenômenos de florações e planejar ações de monitoramento ambiental nas áreas afetadas, particularmente aquelas sujeitas a impactos antrópicos e em áreas de cultivo comercial de organismos (Enevoldsen, 1995).

Entre os diferentes grupos algais (dinoflagelados, diatomáceas, rafidófitas, cianófitas) do fitoplâncton, estima-se que 300 das 3.400 - 4.100 espécies podem produzir florações (Smayda, 1997). As diatomáceas, quando produzem florações, podem causar mortandade de organismos marinhos através da (i) produção de toxinas, como ácido domóico (*Pseudonitzschia* spp.), (ii) dificuldade respiratória devido à irritação da mucosa branquial de peixes causada por setas e espinhos presentes nas frústulas de *Chaetoceros* spp., (iii) absorção acelerada de nutrientes causando a diminuição de outras células do fitoplâncton consumidas pelo zooplâncton e (iv) anoxia na coluna d'água decorrente da decomposição incompleta das diatomáceas por bactérias, próximas ao fundo marinho (Hasle & Fryxell, 1995).

Um passo importante para elucidar os mecanismos que desencadeiam os fenômenos de florações é conhecer os requerimentos ambientais básicos da espécie causadora. Estudos nutricionais de microalgas são largamente utilizados para esclarecer o papel de vários agentes químicos produzidos naturalmente. Os cultivos tipo "batch" ou estanques (Werner, 1977; Steemann-Nielsen, 1978) têm

sido amplamente utilizados para o estudo da fisiologia das espécies de microalgas marinhas em relação aos fatores ambientais. Neste tipo de cultivo utiliza-se um volume limitado de meio de cultura contendo nutrientes inorgânicos e orgânicos necessários às algas, e inocula-se um número relativamente pequeno de células, que então são expostas às condições satisfatórias de luz, temperatura e aeração. O aumento do número de células segue um curso característico (Fogg & Thake, 1987, ver Apêndice I.a). Dois meios de cultivo são bastante utilizados em cultivos microalgais. O meio indefinido utiliza água do mar, onde a quantidade de seus componentes químicos são desconhecidos. O meio de cultivo semi-definido utiliza água do mar enriquecida com nutrientes inorgânicos e orgânicos, de composição conhecida (v. Apêndice II).

Desde 1980, a diatomácea cêntrica *Coscinodiscus wailesii* Gran & Angst (1931) tem sido observada em diferentes regiões do mundo formando florações e prejudicando áreas de pesca e cultivo comerciais. A distribuição da espécie, antes restrita ao Pacífico Tropical e ao Atlântico Ocidental, ampliou-se até a Europa, Estados Unidos, Japão e Austrália tornando-se, em algumas áreas, importante componente da comunidade fitoplanctônica (Lange *et al.*, 1992; Rick & Dürselen, 1995; Nehring, 1998). No Brasil, apesar dos vários trabalhos taxonômicos realizados a partir de 1960, a espécie foi citada apenas recentemente no sul do país (Valente-Moreira *et al.*, 1987; Moreira Filho *et al.*, 1990; Fernandes, 1992 e Souza-Mosimann *et al.*, 1993). Portanto, caberia questionar se a espécie seria nativa ou exótica da costa brasileira, considerando que estes registros são bastante recentes.

Alguns efeitos desta espécie no ecossistema marinho apenas recentemente começaram a ser investigados. Nagai *et al.* (1995 e 1995a) observaram danos sérios nas culturas de "Nori" (*Porphyra*) provenientes da absorção acelerada de nutrientes da coluna d'água por *Coscinodiscus wailesii* durante sua floração ocorrida na costa japonesa. Na Baía de Paranaguá, Paraná, já foram registradas florações desta diatomácea (Fernandes, 1992 e observações pessoais), observando-se simultaneamente o decréscimo nas concentrações do fitoplâncton e a diminuição das densidades de zooplâncton (Dr. R.M. Lopes, CEM/UFPR; observações pessoais). Embora a relação entre estes dois eventos não tenha sido efetivamente

demonstrada, a simples possibilidade de consequências negativas para a cadeia trófica motiva ainda mais os estudos sobre a autoecologia da diatomácea.

Coscinodiscus wailesii é uma espécie de grandes dimensões (diâmetro valvar 180-500 μm), podendo produzir pseudoauxósporo ou auxósporo (Nagai & Manabe, 1993; Nagai *et al.*, 1995a). A formação do pseudoauxósporo é independente da intensidade luminosa, embora o tamanho da célula inicial produzida apresente uma correlação positiva com aquele fator abiótico (Nagai & Imai, 1997). Além disso, a espécie pode formar esporos de resistência que sedimentam no fundo, germinando durante os períodos de mistura da coluna d'água (Nagai *et al.*, 1996). As principais características da frústula com importância taxonômica são: face valvar plana, manto ortogonal em relação à superfície, área central hialina de formato irregular e sem formação de rosetas, aréolas em disposição radial (26 a 35 por 10 μm), duas macrorimopórtulas na margem valvar e várias rimopórtulas organizadas em duas fileiras marginais (Schmid & Volcani, 1983; Nagai *et al.*, 1994; Hasle & Lange, 1992). *Coscinodiscus wailesii* é bastante semelhante à *Coscinodiscus concinnus* W. Smith, o qual diferencia-se da anterior por apresentar superfície valvar convexa, 37 - 40 aréolas por 10 μm , entre outras (Hasle & Lange, 1992).

Neste trabalho são fornecidas informações iniciais sobre a dinâmica de crescimento da diatomácea *Coscinodiscus wailesii*, em relação à exclusão ou adição de macronutrientes (nitrato, fosfato e silicato) sob condições de cultivo em laboratório. Utilizou-se o meio de cultura semi-definido Guillard F/2, composto de água do mar filtrada e as soluções estoques de nitrato, fosfato, silicato, metais traços e vitaminas (Guillard, 1975).

2- OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Estabelecer cepas de cultura viáveis de *Coscinodiscus wailesii* que permitam cultivar a espécie em diferentes condições de crescimento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ensaios com culturas de *Coscinodiscus wailesii*, submetidas à adição ou exclusão parcial de macronutrientes (nitrato, fosfato e silicato), traçando as curvas de crescimento da espécie para cada ensaio de laboratório;

- Determinar a taxa máxima de crescimento de *Coscinodiscus wailesii*, através dos métodos de contagem do número de células em microscópio invertido em câmaras de sedimentação.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.a) Coleta do material em campo

Foram realizadas duas coletas de fitoplâncton marinho em maio de 1999, para obtenção das células de *Coscinodiscus wailesii* no litoral do Paraná através de arrasto vertical de curta duração (2 minutos) com rede de plâncton (malha 200 μ m). As amostras foram acondicionadas em frascos de polietileno de 500 ml de capacidade, e armazenadas em caixa de isopor refrigerada. Também coletou-se 10 litros de água do mar, utilizada na preparação dos meios de cultura para as microalgas. Na primeira coleta, realizada próximo a Ilha de Currais (25°44'S e 48°21'W), as amostras de fitoplâncton foram mantidas refrigeradas por um período de 6 horas, até as células serem isoladas por micropipetagem, no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Estudos do Mar / UFPR. Na segunda coleta, realizada no Canal da Galheta próximo a Ilha do Mel (25°34'S e 48°19'W), as amostras de fitoplâncton foram refrigeradas por um curto período (15 minutos), até as células serem isoladas no laboratório. Este último procedimento diminui a atividade fisiológica do material coletado e uma conseqüente deterioração da qualidade da amostra. Os valores de temperatura e salinidade foram, respectivamente, 23°C e 35; na primeira coleta, e 26°C e 33; na segunda.

3.b) Isolamento e manutenção de culturas estoques

Para as técnicas de isolamento e purificação das culturas algais foi utilizado o método de micropipetagem e diluição seriada, descrito por Stein (1973). A manipulação das vidrarias utilizadas na preparação das soluções-estoque dos meios de cultura, manutenção das culturas e execução dos ensaios biológicos seguiram as normas apresentadas em CETESB (1986, ver Apêndice III).

3.c) Obtenção das culturas unialgais

Cento e sessenta células de *Coscinodiscus wailesii* foram isoladas com micropipeta Pasteur sob microscópio estereoscópico, utilizando uma série de diluições (lavagens para se obter culturas teoricamente axênicas) em placa para isolamento de organismos planctônicos. Em seguida, as células foram transferidas para erlenmeyers de 250 ml de capacidade contendo 100 ml de meio de cultura Guillard F/2 (salinidade 32 e pH 8,1) e mantidos em sala de cultivo com temperatura controlada de 25°C. Os frascos receberam em sua parte superior e frontal uma radiação luminosa média de 5000 lux, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia em um fotoperíodo contínuo. Para a agitação dos frascos-teste utilizou-se mesas agitadoras (shakers), ininterruptamente a 400 rpm (Foto 01).

Oito dias depois 20 células foram reisoladas da cultura mãe com uma série de diluições, onde cada célula passou por uma série de 9-12 placas de Petri contendo meio Guillard F/2 para então serem armazenadas em frascos-teste (erlenmeyers). Após 6 dias de crescimento, as células desta cultura foram reisoladas, 1 célula para cada erlenmeyer, de onde foram obtidos 14 clones denominados C1L, C2L, ..., C14L, que foram mantidos em condições não limitantes de crescimento - luz, temperatura, nutrientes e agitação. Após mais 6 dias, as culturas já se encontravam em fase exponencial, então foram mantidas por mais 48 horas com fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas de escuro. Em seguida, as culturas foram repicadas, e uma semana depois utilizou-se o clone C10L para as séries de experimentos descritas a seguir.

3.d) Experimentos

Realizou-se duas séries de experimentos. Foram inoculadas 50 células de *Coscinodiscus wailesii* em cada réplica (frascos-teste contendo 100 ml de meio de cultura), resultando em concentração final de 0,5 céls/ml. A partir do início do experimento os frascos foram mantidos com fotoperíodo contínuo durante 24 horas; depois mantinha-se o ciclo luz:escuro de 8:16 horas. A cada 24 horas de experimento, no final do período de luz, retirava-se de cada frasco uma sub-amostra



Foto 01. Vista geral da câmara de cultivo do Laboratório de Ecotoxicologia - CEM, mostrando agitadores, erlenmeyers com cultivo de *Coscinodiscus wailesii* e a iluminação utilizada.



Foto 02. Material preparado para retirada de alíquotas para contagem das células dos meios de cultivo.

de 5 ml, e fixava-a com lugol acético (Foto 02), para posteriormente ser contada em microscópio invertido ZEISS ID08. Utilizou-se cubas de sedimentação de 10 ml, e as células que aderiam-se no frasco eram pipetadas, diminuindo o erro sub-amostral. As taxas de crescimento (μ), expressas em termos de número de divisões celulares por dia, foram calculadas segundo a equação (Stein, 1973):

$$\mu = \{ (\text{Log } N_1) - (\text{Log } N_0) \cdot (3,322 / t) \}, \text{ onde:}$$

N_1 = nº de células no tempo t em dias;

N_0 = nº de células no tempo $t-1$;

t = tempo decorrido entre as observações em dias;

3,322 = fator para a divisão celular.

Série 01

Na primeira série utilizou-se 10 réplicas, incubadas durante 9 dias sob condições não limitantes de luz e temperatura constantes, sob agitação contínua. Cinco meios de cultura foram preparados: meio Guillard F/2 completo, meio Guillard F/2 sem nitrato, meio Guillard F/2 sem fosfato, meio Guillard F/2 sem silicato e meio indefinido. Os diâmetros das células de 3 réplicas ao longo do experimento foram medidos em microscópio invertido. Dados de concentração de clorofila-a foram obtidos nos 1º, 6º e 9º dias, extraíndo-se os pigmentos com acetona 90%, e determinados por fluorimetria de acordo com as recomendações e equações do SCOR-UNESCO (1966).

Série 02

Na segunda série utilizou-se 5 réplicas que foram incubadas durante 11-12 dias sob condições não limitantes de luz e temperatura constantes, sob agitação contínua. Cinco meios de cultura foram preparados: meio Guillard F/2 completo, meio indefinido com a adição da solução estoque de nitrato do meio Guillard F/2, meio indefinido com a solução de fosfato, meio indefinido com a solução de silicato e meio indefinido. Obteve-se valores de concentração de silicato, fosfato, nitrato e nitrito, no primeiro e último dias, analisados com um auto-analisador Technicon de acordo com as recomendações de Strickland & Parsons (1968).

3.e) Preparação do material para a taxonomia de *Coscinodiscus wailesii*

Uma alíquota foi utilizada para a taxonomia, a partir de amostras coletadas conforme descrito anteriormente, acondicionadas em frascos de polietileno e preservadas com formaldeído 1%. Estas amostras foram preparadas segundo a técnica de Hasle & Fryxell (1970) para limpeza das frústulas e preparação de lâminas permanentes, utilizando Naphrax como meio de inclusão e posterior observação em microscópio ótico (MO) Olympus BX40 com equipamento fotográfico; e em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Phillips mod. XL30, utilizado em voltagem de aceleração de 25 Kv. A terminologia para descrição das estruturas segue aquela recomendada por Ross *et al.* (1979) e Round *et al.* (1990).

4- RESULTADOS

4.a) Série 01

As dimensões das células variaram de 306 a 268 μm de diâmetro valvar e 197 a 95 μm de eixo pervalvar, entre as 2809 células medidas durante o cultivo.

A Figura 01 mostra os gráficos das curvas de crescimento das células de *Coscinodiscus wailesii* para os diferentes tratamentos utilizados.

No meio de cultura Guillard F/2 (Figura 01 - A) a fase de indução foi curta, estendendo-se até o segundo dia do experimento, com 1,33 μg de clorofila/l (Tabela II) para o inóculo inicial (instante T0) e taxa de crescimento de 2,43 para o primeiro dia do experimento (Tabela I). A fase exponencial ocorreu entre os dias 3 e 5 com taxa máxima de crescimento de 1,27 no terceiro dia, e máximo de 36,4 céls/ml (média das dez réplicas) e 96,42 μg de clorofila/l no quinto dia. A partir do sexto dia de experimento observou-se taxa de crescimento próxima a 0,1, que pode estar indicando o início da fase estacionária. No oitavo dia observou-se máximos de 42,2 céls/ml e 54,93 μg de clorofila/l.

Para o meio de cultura Guillard F/2 sem silicato (Figura 01 - B) a fase de indução foi até o segundo dia do experimento. Observou-se 0,97 μg de clorofila/l (Tabela II) para o inóculo inicial e taxa de crescimento 1,77 para o primeiro dia do experimento (Tabela I). A fase exponencial ocorreu entre os dias 3 e 6, com taxa máxima de crescimento de 1,10. Observou-se nesta fase um máximo de 37,7 céls/ml no sexto dia. A fase estacionária foi observada a partir do sétimo dia de experimento com taxa de crescimento de 0,29. Obteve-se máximos de 46 céls/ml no sétimo dia e 45,37 μg de clorofila/l no oitavo dia.

Para os dois tratamentos analisados anteriormente, observou-se maiores diferenças de desvio-padrão entre as réplicas em relação as contagens celulares nos últimos dias (sexto ao oitavo) de cultivo (Figura 01 - A e B).

No meio de cultura Guillard F/2 sem fosfato (Figura 01 - C) observou-se 0,74 μg de clorofila/l no início do experimento e taxa de crescimento 1,49 para o primeiro

dia (Tabela I), sendo que nos outros dias essa taxa não ultrapassou 0,84. A maior densidade celular foi observada no quinto dia, com 7,1 céls/ml, 0,82 µg de clorofila/l e taxa de crescimento de 0,32. No oitavo dia observou-se um pico de 7,18 µg de clorofila/l e densidade celular média de 6,7 céls/ml.

Para o meio de cultura sem nitrato (Figura 01 - D) observou-se 1,12 µg de clorofila/l para o inóculo inicial e 1,26 de taxa de crescimento para o primeiro dia de experimento (Tabela I). Para os outros dias esta taxa não ultrapassou 0,7. A maior densidade celular foi no quinto dia com 2,9 céls/ml e 1,29 µg de clorofila/l. No oitavo dia observou-se 1,5 cél/ml e 0,64 µg de clorofila/l.

No meio indefinido (Figura 01 - E) observou-se 1,08 µg de clorofila/l para o inóculo inicial e 1,59 de taxa de crescimento para o primeiro dia de experimento (Tabela I). Para os outros dias esta taxa não ultrapassou 0,49; exceto para o quinto dia que alcançou 1,0. A maior densidade celular foi observada no quinto dia com 3,8 céls/ml e 5,85 µg de clorofila/l. No oitavo dia observou-se 1,2 céls/ml e 0,42 µg de clorofila/l.

Nestes últimos três tratamentos o crescimento algal foi reduzido.

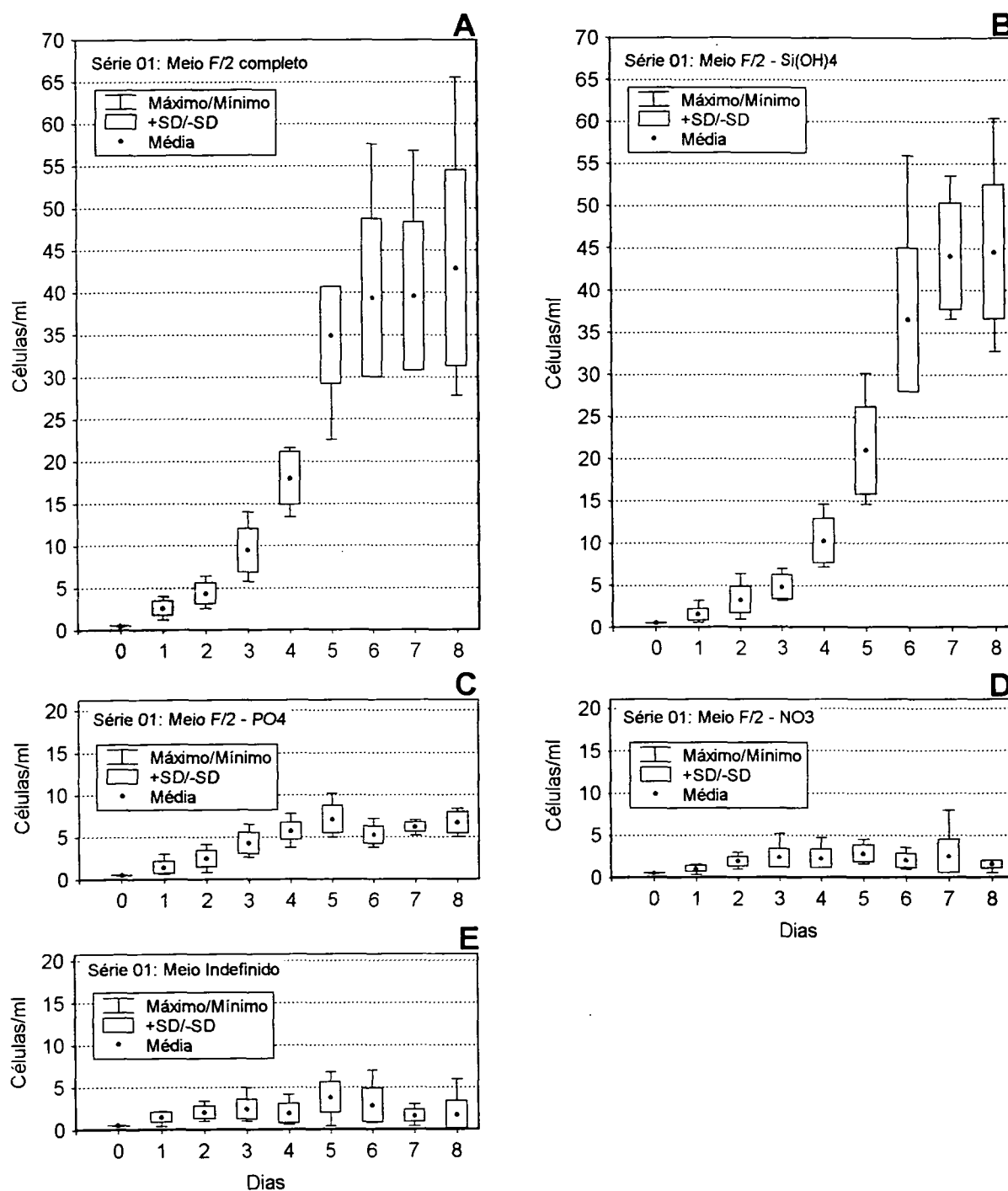


Fig. 01. Curvas de crescimento de *Coscinodiscus wailesii*, cultivado em Meio Guillard F/2 completo; Meio Guillard F/2 sem Silicato [- Si(OH)₄]; sem Fosfato (- PO₄); sem Nitrato (- NO₃) e Meio Indefinido. Em cada gráfico também estão representadas as concentrações máxima e mínima para as 10 réplicas, e seu respectivo desvio-padrão.

Tabela I. Taxas de crescimento e densidades de células de *Coscinodiscus wailesii*, nos cinco tratamentos da série 01 de experimentos, baseadas em contagem celular. céls/ml = número de células por mililitro de cultura \pm o desvio-padrão; Min/Máx. = valores mínimos e máximos nas contagens celulares entre as 10 réplicas, μ = taxa de crescimento, expressa em números de divisões/dia; T = tempo em dias.

T		F/2 completo	F/2 - Si(OH) ₄	F/2 - PO ₄	F/2 - NO ₃	Indefinido
0	cél/ml	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0
	Min/Máx.	0,5 - 0,5	0,5 - 0,5	0,5 - 0,5	0,5 - 0,5	0,5 - 0,5
	μ	-	-	-	-	-
1	cél/ml	2,7 \pm 1,0	1,7 \pm 0,9	1,4 \pm 0,7	1,2 \pm 0,4	1,5 \pm 0,7
	Min/Máx.	1,2 - 4,0	0,6 - 3,2	0,6 - 3,0	0,4 - 1,6	0,4 - 2,2
	μ	2,43	1,77	1,49	1,26	1,59
2	cél/ml	4,2 \pm 1,1	3,3 \pm 1,6	2,5 \pm 1,0	1,9 \pm 0,6	2,1 \pm 0,8
	Min/Máx.	2,6 - 5,2	1,0 - 6,4	0,8 - 4,2	1,0 - 3,0	1,0 - 3,4
	μ	0,64	0,96	0,84	0,66	0,49
3	cél/ml	10,1 \pm 2,3	5,0 \pm 1,4	4,3 \pm 1,3	2,4 \pm 1,1	2,4 \pm 1,2
	Min/Máx.	5,8 - 13,8	3,2 - 7,0	2,6 - 6,6	1,4 - 5,2	1,0 - 5,0
	μ	1,27	0,60	0,78	0,34	0,19
4	cél/ml	18,1 \pm 3,0	10,7 \pm 2,6	5,7 \pm 1,0	2,3 \pm 1,1	1,9 \pm 1,2
	Min/Máx.	14,0 - 21,6	7,2 - 14,6	3,8 - 7,8	1,2 - 4,8	0,6 - 4,2
	μ	0,84	1,10	0,41	0	0
5	cél/ml	36,4 \pm 6,4	21,7 \pm 5,6	7,1 \pm 1,9	2,9 \pm 1,1	3,8 \pm 1,8
	Min/Máx.	22,6 - 45,4	14,6 - 30,2	5,0 - 10,2	1,7 - 4,6	0,4 - 6,8
	μ	1,01	1,02	0,32	0,33	1,00
6	cél/ml	39,5 \pm 9,3	37,7 \pm 8,4	5,3 \pm 1,1	2,0 \pm 0,9	2,8 \pm 2,1
	Min/Máx.	30,2 - 57,6	30,0 - 56,0	3,8 - 7,2	1,0 - 3,6	0,8 - 7,0
	μ	0,12	0,80	0	0	0
7	cél/ml	38,9 \pm 8,7	46,0 \pm 7,1	6,2 \pm 0,6	1,8 \pm 0,7	1,6 \pm 0,8
	Min/Máx.	31,4 - 56,8	36,6 - 56,8	5,2 - 7,0	0,8 - 3,0	0,4 - 3,0
	μ	0	0,29	0,23	0	0
8	cél/ml	42,2 \pm 11,9	44,9 \pm 8,0	6,7 \pm 1,3	1,5 \pm 0,5	1,2 \pm 0,7
	Min/Máx.	27,8 - 65,6	32,8 - 60,4	5,0 - 8,4	0,6 - 2,0	0,2 - 2,6
	μ	0,12	0	0,11	0	0

Tabela II. Valores de clorofila ($\mu\text{g/l}$), nos cinco tratamentos da série 01 de experimentos com *Coscinodiscus wailesii*. T = tempo em dias.

T	F/2 completo	F/2 - Si(OH) ₄	F/2 - PO ₄	F/2 - NO ₃	Indefinido
0	1,33	0,97	0,74	1,12	1,08
5	96,72	11,76	0,82	1,29	5,85
8	54,93	45,37	7,18	0,64	0,42

4.b) Série 02

A Figura 02 ilustra os gráficos de curvas de crescimento das células de *Coscinodiscus wailesii* para os diferentes tratamentos utilizados na série 02. Nestes tratamentos, exceto para o meio Guillard F/2, o crescimento algal foi reduzido não observando-se as suas fases características.

No meio de cultura indefinido (Figura 02 - A), observou-se maior densidade celular (3,8 céls/ml), no terceiro dia. A taxa de crescimento para o primeiro dia de experimento foi 1,93 (Tabela III). Para os outros dias a taxa máxima foi 0,58.

No meio de cultura indefinido com silicato (Figura 02 - B), observou-se taxa de crescimento de 1,85 para o primeiro dia e 1,19 para o terceiro dia do experimento (Tabela III). Nos outros dias as taxas não ultrapassaram 0,7. A maior densidade celular ocorreu no sexto dia, com 5,2 céls/ml.

No meio de cultura indefinido com fosfato (Figura 02 - C) a taxa de crescimento foi de 1,59 no primeiro dia e 0,95 no décimo dia (Tabela III). Nos outros dias as taxas não ultrapassaram 0,49. A maior densidade celular ocorreu no décimo dia, com 3,1 céls/ml.

Para o meio de cultura indefinido com nitrato (Figura 02 - D) observou-se 1,77 de taxa de crescimento para o primeiro dia de experimento (Tabela III). Para os outros dias as taxas não ultrapassaram 0,75. A maior densidade celular ocorreu no décimo dia, com 8,9 céls/ml.

No meio de cultura Guillard F/2 completo (Figura 02 - E) observou-se taxa de crescimento (μ) de 1,00 para o primeiro dia, e 1,93 no segundo dia do experimento (Tabela III). No oitavo dia ocorreu a taxa máxima de crescimento de 0,73, com densidade média de 21,9 céls/ml. As células apresentaram a maior densidade entre os dias 8 e 11, com 40,3 céls/ml no décimo primeiro dia.

Como padrão geral, todos os nutrientes (silicato, fosfato, nitrato e nitrito) tiveram redução no meio de cultura ao longo do experimento (Tabela IV). Nos meios F/2 completo e indefinido com nitrato houve aumento de nitrito. Entretanto, no dia final do experimento, passaram de 0,63 μM para 1,84 μM , e de 1,11 μM para 2,65 μM , respectivamente. O silicato também apresentou pequeno aumento nos meios indefinido e indefinido mais fosfato.

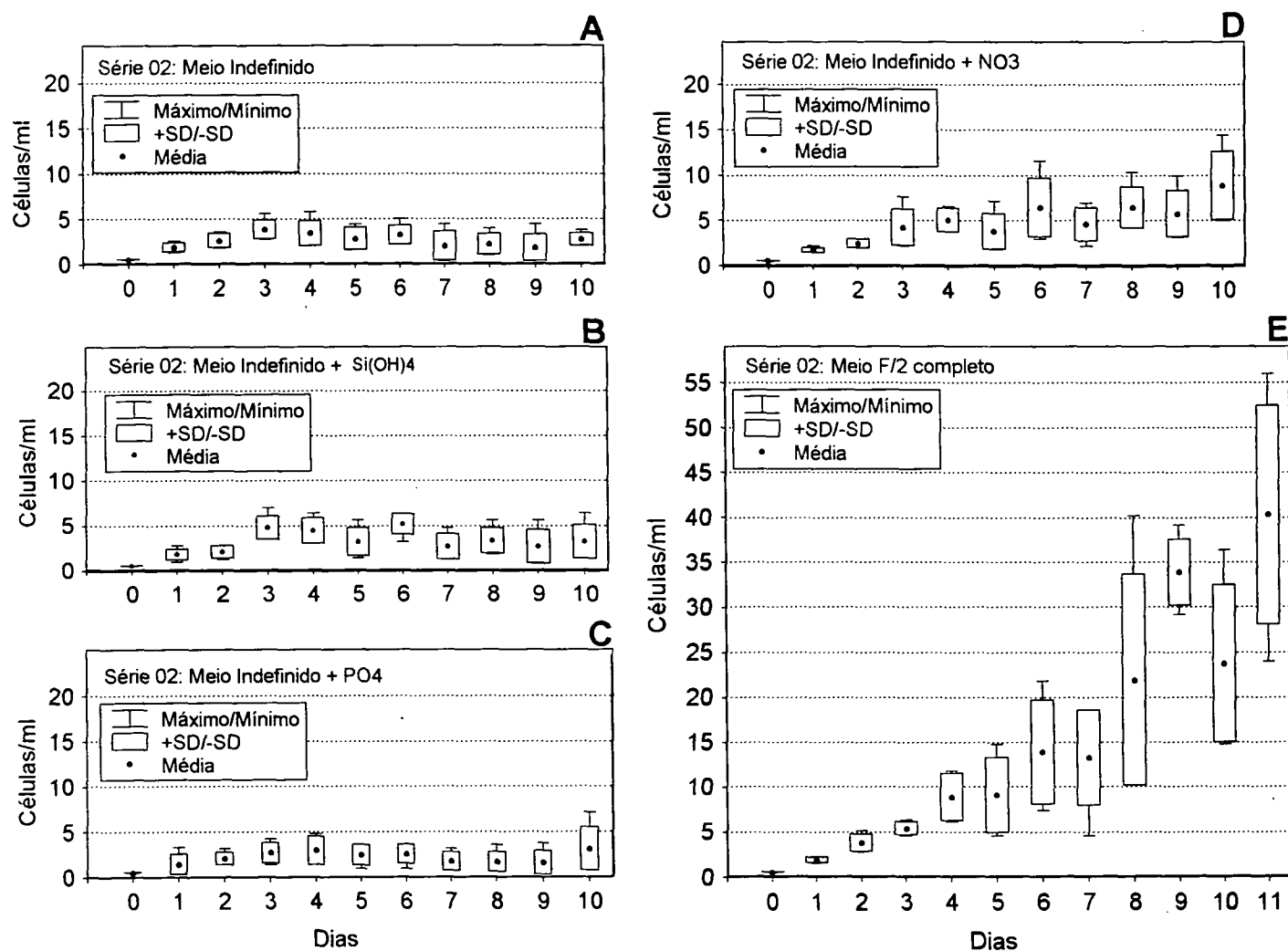


Fig. 02. Curvas de crescimento de *Coscinodiscus wailesii*, cultivado em Meio Guillard F/2 completo; Meio Indefinido; Meio Indefinido com adição de Silicato [+ Si(OH)_4]; Meio Indefinido com adição de Fosfato (+ PO_4) e Meio Indefinido com adição de Nitrato (+ NO_3). Em cada gráfico também estão representadas as concentrações máxima e mínima para as 5 réplicas, e seu respectivo desvio-padrão.

Tabela III. Taxas de crescimento e densidades de células de *Coscinodiscus wailesii*, nos cinco tratamentos da série 02 de experimentos, baseadas em contagem celular. céls/ml = número de células por mililitro de cultura \pm o desvio-padrão; Mín/Máx. = valores mínimos e máximos nas contagens celulares entre as 5 réplicas, μ = taxa de crescimento, expressa em números de divisões/dia.

T(dias)		Indefinido	Indef. + Si(OH) ₄	Indef. + PO ₄	Indef. + NO ₃	F/2 completo
0	cél/ml	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0
	Mín/Máx.	0,5-0,5	0,5-0,5	0,5-0,5	0,5-0,5	0,5 - 0,5
	μ	-	-	-	-	-
1	cél/ml	1,9 \pm 0,5	1,8 \pm 0,7	1,5 \pm 1,1	1,7 \pm 0,3	1,0 \pm 0,3
	Mín/Máx.	1,3 - 2,6	1,0 - 2,8	0,3 - 1,6	1,5 - 2,2	1,0 - 2,3
	μ	1,93	1,85	1,59	1,77	1,00
2	cél/ml	2,6 \pm 0,8	2,1 \pm 0,7	2,1 \pm 0,7	2,5 \pm 0,5	3,8 \pm 1,0
	Mín/Máx.	1,8 - 3,6	1,2 - 2,8	1,4 - 3,2	2,0 - 3,0	2,8 - 5,2
	μ	0,45	0,22	0,49	0,56	1,93
3	cél/ml	3,8 \pm 1,0	4,8 \pm 1,3	2,7 \pm 1,1	4,2 \pm 2,0	5,4 \pm 0,7
	Mín/Máx.	2,8 - 5,6	3,8 - 7,0	1,4 - 4,2	2,2 - 7,6	4,6 - 6,4
	μ	0,55	1,19	0,36	0,75	0,51
4	cél/ml	3,4 \pm 1,4	4,4 \pm 1,4	3,0 \pm 1,6	5,1 \pm 1,3	8,9 \pm 2,7
	Mín/Máx.	2,2 - 5,8	3,2 - 6,4	1,4 - 4,8	3,8 - 6,6	6,2 - 11,8
	μ	0	0	0,15	0,28	0,72
5	cél/ml	2,8 \pm 1,3	3,2 \pm 1,6	2,5 \pm 1,2	3,8 \pm 2,0	9,1 \pm 4,2
	Mín/Máx.	1,6 - 4,4	1,4 - 5,6	1,0 - 3,6	2,0 - 7,2	4,6 - 14,8
	μ	0	0	0	0	0,03
6	cél/ml	3,2 \pm 1,1	5,2 \pm 1,2	2,6 \pm 1,1	6,4 \pm 3,2	13,9 \pm 5,8
	Mín/Máx.	2,4 - 5,0	3,2 - 5,8	1,0 - 3,6	3,0 - 11,6	7,4 - 21,8
	μ	0,19	0,70	0,06	0,75	0,61
7	cél/ml	2,0 \pm 1,7	2,7 \pm 1,4	1,8 \pm 1,0	4,6 \pm 1,9	13,2 \pm 5,3
	Mín/Máx.	0,4 - 4,4	1,2 - 4,8	0,8 - 3,2	2,2 - 7,0	4,6 - 17,8
	μ	0	0	0	0	0
8	cél/ml	2,4 \pm 1,0	3,3 \pm 1,5	1,7 \pm 1,1	6,4 \pm 2,3	21,9 \pm 12,0
	Mín/Máx.	1,0 - 4,0	1,8 - 5,6	0,6 - 3,6	4,6 - 10,4	12,0 - 40,2
	μ	0,26	0,29	0	0,48	0,73
9	cél/ml	1,8 \pm 1,5	2,7 \pm 1,9	1,6 \pm 1,3	5,8 \pm 2,6	33,9 \pm 3,7
	Mín/Máx.	0,6 - 4,4	0,8 - 5,6	0,6 - 3,8	3,2 - 10,0	29,2 - 39,2
	μ	0	0	0	0	0,63
10	cél/ml	2,7 \pm 1,2	3,2 \pm 1,9	3,1 \pm 2,4	8,9 \pm 3,8	23,7 \pm 8,8
	Mín/Máx.	2,0 - 3,8	1,8 - 6,4	1,4 - 7,2	5,0 - 14,4	14,8 - 36,4
	μ	0,58	0,25	0,95	0,62	0
11	cél/ml	-	-	-	-	40,3 \pm 12,0
	Mín/Máx.	-	-	-	-	24,0 - 56,0
	μ	-	-	-	-	0,77

Tabela IV. Dados da concentração média de nutrientes das cinco réplicas - Silicato, Fosfato, Nitrato e Nitrito - para os meios de cultura de *Coscinodiscus wailesii* para os instantes T0 (inóculo inicial do cultivo) e T10 nos cinco tratamentos da série 02 de experimentos.

T(dias)	Nutriente	Indefinido	Indef. + Si(OH) ₄	Indef. + PO ₄	Indef. + NO ₃	F/2 completo
0	Si(OH)₄	102,59	102,36	102,19	103,10	102,36
10	"	103,38	101,74	102,36	100,77	5,74
0	PO₄	0,75	1,69	24,95	1,96	16,55
10	"	0,24	0,44	17,00	0,19	10,95
0	NO₃	13,10	1,97	3,90	15,26	15,64
10	"	8,17	1,30	3,44	13,64	14,44
0	NO₂	1,42	1,17	1,12	1,11	0,63
10	"	0,57	0,52	0,57	2,65	1,84

4.c) Descrição de *Coscinodiscus wailesii* (Pranchas I, II e III)

A morfologia da espécie já foi investigada por outros autores (Cupp, 1943; Schmid *et al.*, 1983; Rincé & Paulmier, 1986; Hasle & Lange, 1992; Nagai & Manabe, 1993; Nagai *et al.*, 1995 e 1995a; Hasle & Fryxell, 1995; Hasle & Syvertsen, 1996; Nagai & Imai, 1997), e apenas características diagnósticas e informações complementares serão descritas aqui.

As células são cilíndricas com superfície valvar plana a discretamente côncava (Fig. 1). O manto é ortogonal em relação à superfície valvar (Fig. 1). Os cloroplastos são discóides, pequenos e numerosos, distribuídos na periferia celular (Figs. 1-2). O núcleo encontra-se suspenso por fibrilas citoplasmáticas no centro da célula, interrompendo o grande vacúolo, e é facilmente visualizado em vista lateral (Fig. 3).

As valvas cultivadas neste trabalho em meio F/2 completo apresentaram 306 a 268 µm de diâmetro valvar, e 197 a 95 µm de eixo pervalvar. As células provenientes de populações naturais da Baía de Paranaguá apresentaram 195 a 385 µm de diâmetro valvar e 112 a 210 µm de eixo pervalvar. Os valores encontrados na literatura foram 230 a 350 µm de diâmetro valvar em Cupp (1943); 280 a 500 µm de diâmetro e 130 a 350 µm de eixo pervalvar em Schmid *et al.* (1983); 240 a 340 µm de diâmetro e 170 a 210 µm de eixo pervalvar em Rincé & Paulmier (1986); 290 a 370 µm de diâmetro e eixo pervalvar com aproximadamente

a metade do diâmetro em Hasle & Lange (1992); e 280 a 500 μm de diâmetro valvar (550 a 50 μm em condições de laboratório) em Hasle & Syvertsen (1996).

A superfície valvar tem aréolas hexagonais, 32-35 em 10 μm , com disposição nitidamente radial (Figs. 4-5). A aréola tem uma estrutura complexa, com 10-13 poros cribrais circundados por poros maiores cortados por uma barra silicosa, e um grande foramen circular interno (Figs. 12-15).

Na região central externa foram encontradas duas variações básicas: uma área hialina bem desenvolvida; ou uma roseta central composta por aréolas (Figs. 6-11). Neste caso, pode existir ou não uma pequena região hialina circundada pelas aréolas da roseta central (Figs. 6-8). É importante ressaltar que, quando observadas com microscópio eletrônico de varredura (MEV), a área hialina portando interestrias localiza-se no lado interno da valva, e que em seu lado externo pode haver aréolas da roseta central ou uma área hialina circular sem interestrias, substituindo a roseta (Figs. 13-14). Quando ocorre uma roseta central, o lado interno da valva também apresenta uma área hialina. Várias rimopórtulas estão espalhadas pela superfície (Fig. 15). Em vista interna, cada rimopórtula está projetada através de um tubo longo (i.e, não sésseis), e a estrutura labiada (semicircular e côncava) está curvada em um ângulo de 60-90° (Figs. 18-19). Externamente, há uma abertura circular simples (v. Hasle & Lange, 1992).

O manto é ortogonal e reto, apresentando duas fileiras de rimopórtulas (Figs. 16-17). Uma situa-se na conexão entre a superfície valvar e o manto; e a outra na borda do manto. Esta última apresenta duas macrorimopórtulas de morfologia bem característica (Fig. 16), ou seja, com a abertura interna formada por duas projeções silicosas em forma de espiral. Várias interestrias hialinas ocorrem, cada uma terminando em uma rimopórtula (Figs. 16-17).

Prancha I

Figs. 1-11. Fotomicrografias de *Coscinodiscus wailesii* em microscópio ótico (MO); Baía de Paranaguá - Paraná. Figs. 1-3. Células vivas em vista valvar (Fig. 1) e pleural (Figs. 2-3). Note cloroplastos discóides e o núcleo suspenso por fibrilas citoplasmáticas (setas). Escalas = 50 μm . Figs. 4-11. Valvas limpas com ácido. Escalas = 10 μm . Figs. 4-5. Vista geral de valvas mostrando a região central formando área hialina com interestrias; ou roseta central típica. Figs. 6-11. Regiões centrais, mostrando diferentes tipos de rosetas. Repare na área hialina circundada pelas aréolas da roseta nas Figs. 6-8.

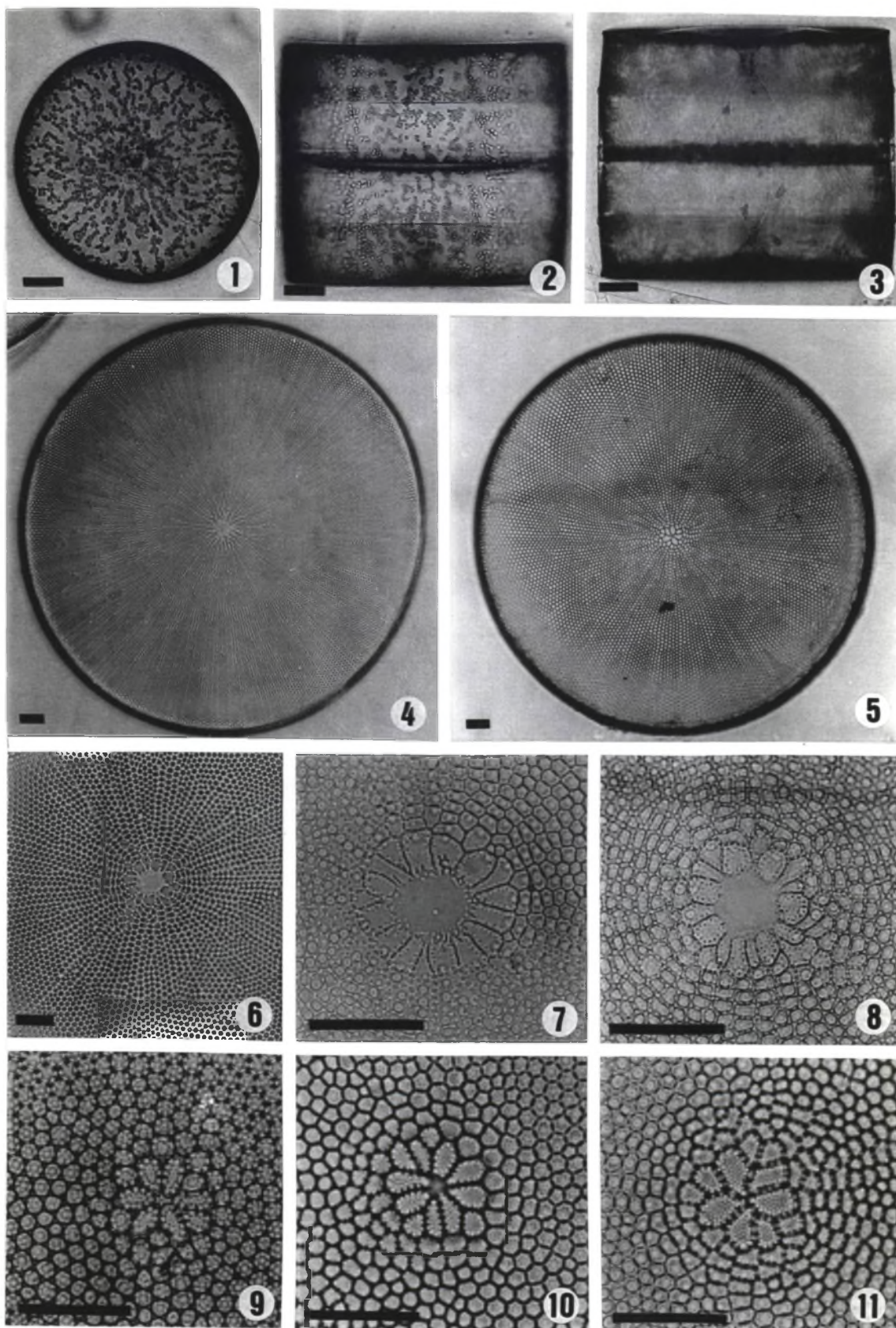
Prancha II

Figs. 12-15. *Coscinodiscus wailesii*, Baía de Paranaguá - Paraná em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Regiões centrais da valva. Escalas = 10 μm . Figs. 12-13. Vistas externas mostrando a presença e ausência de roseta central. Figs. 14-15. Vistas internas da área hialina, do qual partem várias interestrias. Algumas rimopórtulas da superfície valvar estão também indicadas (setas).

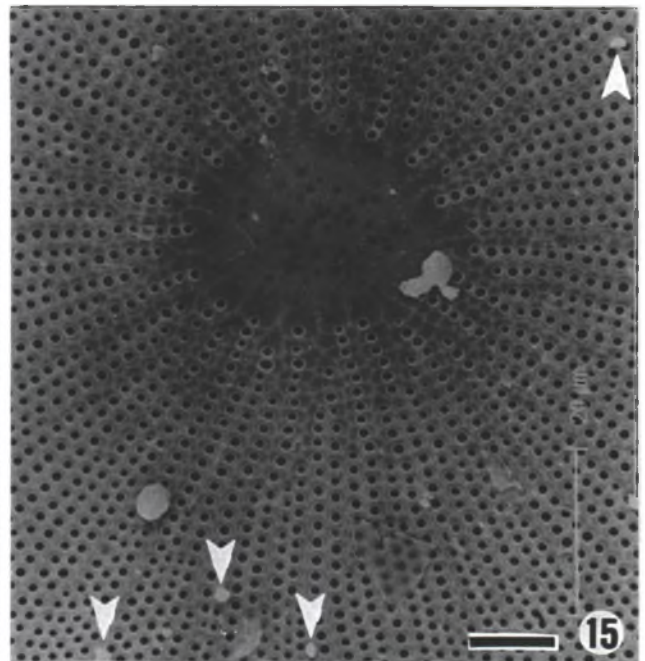
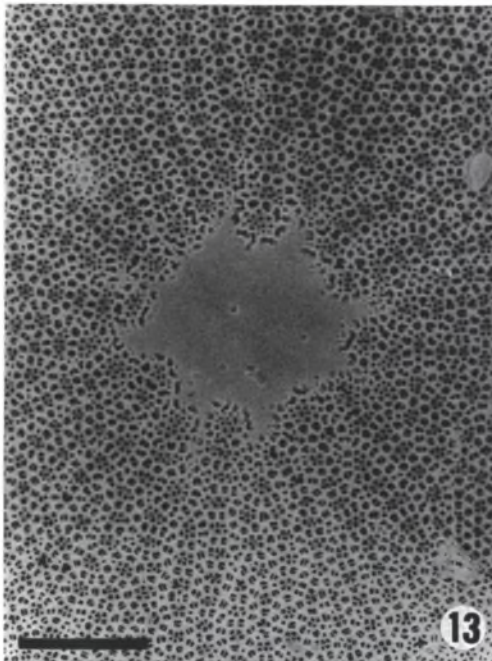
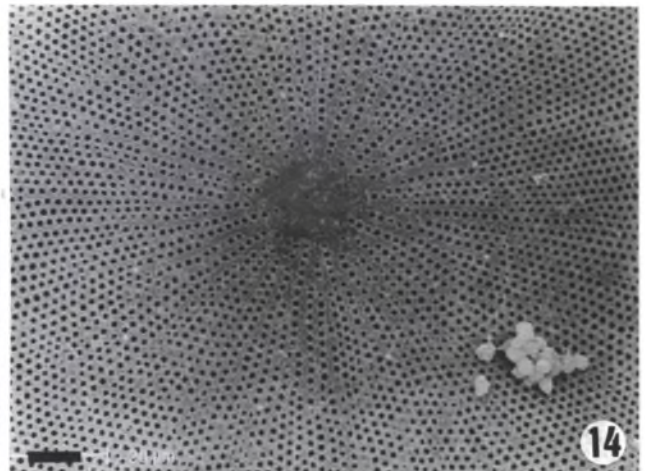
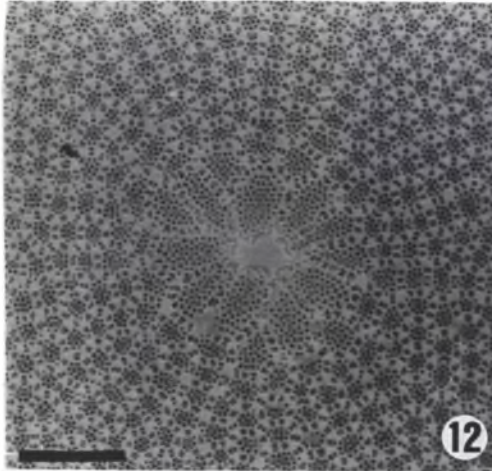
Prancha III

Figs. 16-19. *Coscinodiscus wailesii*, Baía de Paranaguá - Paraná em MEV. Vistas internas da margem valvar e manto, e da superfície valvar. Figs. 16-17. Rimopórtulas pequenas na conexão entre a superfície valvar e o manto (setas brancas), e na margem do manto (setas negras). Escalas = 10 μm . Na Fig. 16 está indicada a macrorimopórtula (MR). Note também as interestrias nascendo das rimopórtulas. Fig. 18. Detalhe de três rimopórtulas da margem valvar. Note sua orientação para o mesmo lado e o ângulo formado pela estrutura labiada. Escalas = 5 μm . Fig. 19. Detalhe de duas rimopórtulas localizadas na superfície valvar. Escalas = 5 μm .

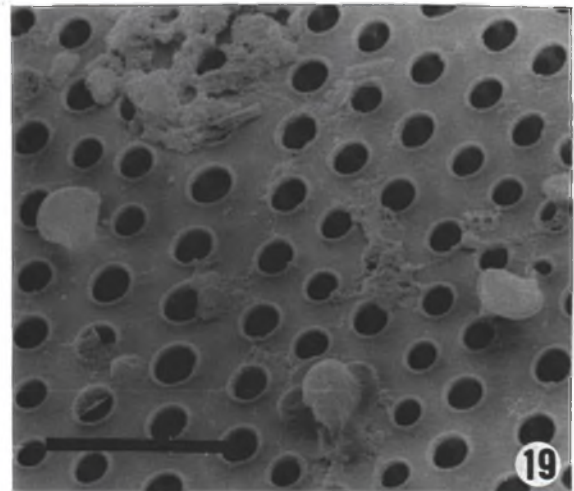
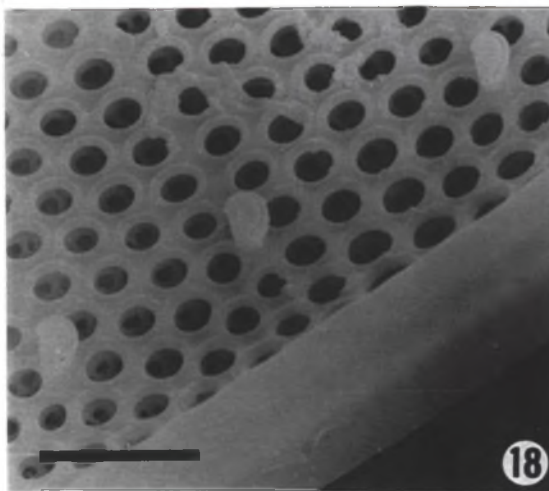
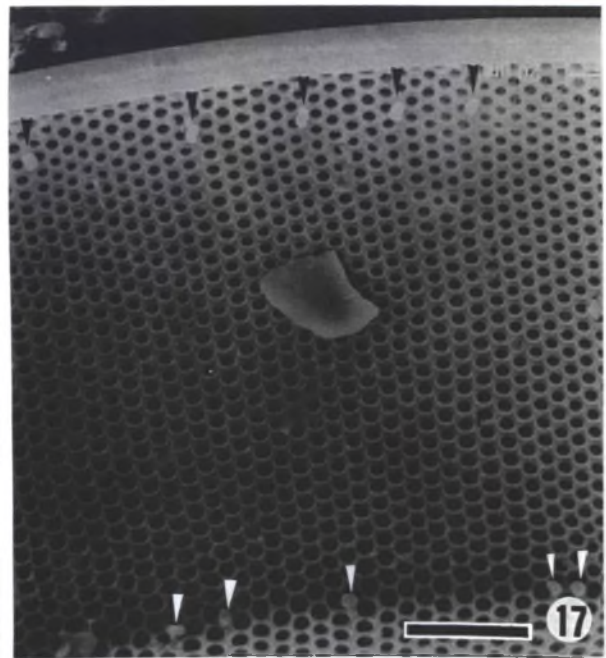
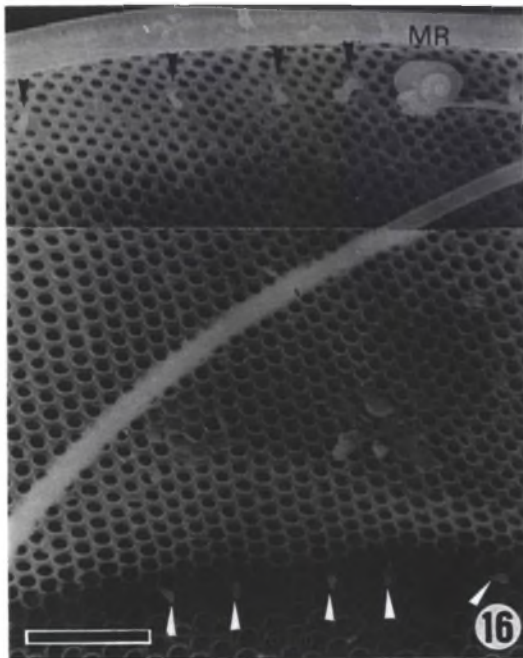
PRANCHA I



PRANCHA II



PRANCHA III



5- DISCUSSÃO

5.a) Problemas técnicos durante as duas séries de experimentos

Uma primeira tentativa de cultivo unialgal de *Coscinodiscus wailesii* não foi bem sucedida, o que pode ser atribuído a dois fatores principais: período prolongado entre o momento da coleta e o isolamento da alga em laboratório, e a diferença entre a salinidade do local da coleta (35) e da água do meio de cultivo preparado (30). Na segunda tentativa, assunto desta monografia, os cultivos foram estabelecidos com sucesso, e estão discutidos a seguir.

Apesar de suas grandes dimensões (268-306 μm de diâmetro valvar), as células se dividiram rapidamente ($\mu = 1,27$) durante os experimentos e foram mantidas em condições de laboratório por um período de mais de três meses.

Alguns cuidados relativos à metodologia devem ser tomados, como os descritos a seguir. A espécie produz uma mucilagem que adere a célula ao frasco de cultivo, podendo causar erros de amostragem no momento de retirar as alíquotas para a contagem. As grandes dimensões da célula (306 x 197 μm - medidas do cultivo) provocam rápida sedimentação, influenciando nas leituras de fluorescência, ou aumentam os erros das estimativas de clorofila e de contagem celular. O elevado desvio-padrão das réplicas em relação aos valores médios de densidades em ambas as séries de experimentos deve ter sido causado pelas características da espécie descritas acima (tamanho, mucilagem, etc) e pela diferença de intensidade luminosa recebida pelos frascos-teste nas mesas agitadoras. Procurou-se minimizar este erro da seguinte forma: na primeira série de experimentos, após o período de 8 horas de luz, os frascos eram reposicionados nas mesas agitadoras, de forma a permitir que todos recebessem intensidade luminosa semelhantes, durante o experimento. Na segunda série de experimentos os frascos eram reposicionados de 4 em 4 horas, no período de luz.

5.b) Série 01

Os altos valores de taxa de crescimento encontrados no primeiro dia para todos os tratamentos nas duas séries de experimentos deveram-se a indução do crescimento através de fotoperíodo contínuo, desta forma encurtando a fase lag (ou de indução).

Nos meios F/2 completo e F/2 sem sílica ocorreram os maiores valores de clorofila-a. A densidade celular foi muito próxima para ambos (Figura 03 - A), devido, provavelmente, a grande quantidade de silicato (Tabela IV) já existente na água do mar utilizada para a preparação dos meios. Portanto, a solução estoque de silicato adicionada ao meio completo não foi determinante do crescimento algal, mas sim a adição de outros nutrientes (fosfato, nitrato, metais traços e vitaminas).

Para os outros meios de cultura (F/2 sem fosfato, sem nitrato e indefinido), as poucas células observadas apresentavam citoplasma muito claro com poucos cloroplastos, após o quarto dia de experimento. Estas alterações celulares seriam consequência, provavelmente, da pequena concentração de nitrato e fosfato existente na água do mar utilizada na preparação do meio de cultivo (Tabela IV), que foi o fator limitante observado para o crescimento. Comparando estes três tratamentos observou-se crescimento um pouco mais evidente no meio F/2 sem fosfato (Figura 03 - A), uma vez que neste meio havia a solução estoque de nitrato, que propiciou melhor equilíbrio na relação de N:P (16:1) do que nos outros dois (Figura 03 D e E), favorecendo o crescimento algal. Ou seja, fosfato e nitrato mostraram-se limitantes nestes experimentos, por isso observou-se um crescimento apenas detectável sem estes nutrientes, enquanto que o silicato não foi limitante.

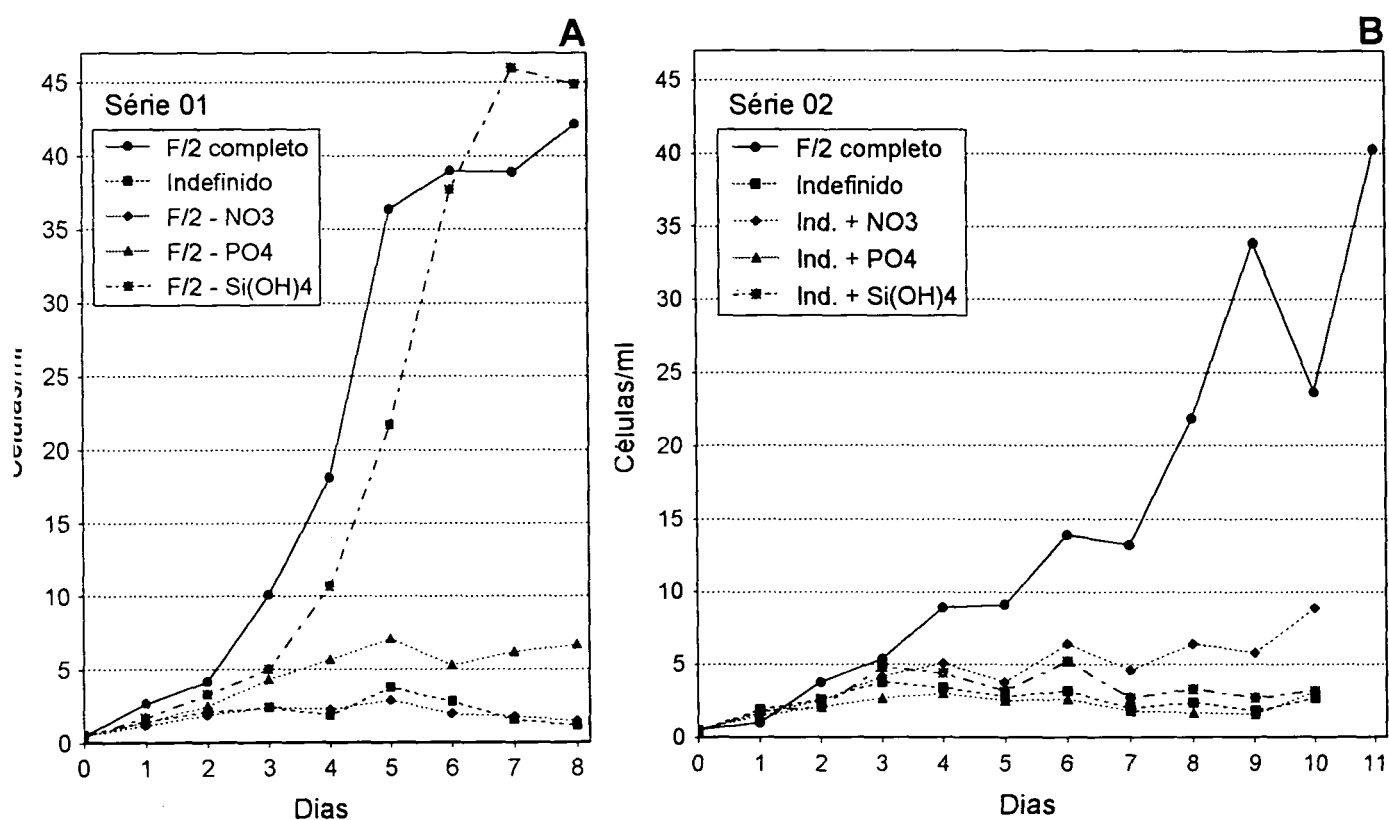


Fig. 03. Curvas de crescimento de *Coscinodiscus wailesii*, em número de células/ml nas duas séries de experimentos. Cada curva corresponde à média de 10 réplicas (série 01) e 5 réplicas (série 02).

5.c) Série 02

Os resultados obtidos para os tratamentos da série 02 (Figura 03 - B) mostraram densidades celulares reduzidas se comparados à série 01 (meios F/2 completo e F/2 sem adição de silicato).

Entretanto, observou-se um crescimento um pouco maior no meio indefinido com adição de nitrato, onde a relação 16:1 (de nitrogênio e fósforo) da própria água do mar utilizada na preparação do meio de cultivo, parece ficar mais equilibrada, favorecendo a absorção destes nutrientes e o crescimento algal.

Os dados de nutrientes obtidos estão dentro dos limites encontrados por outros autores para a região da Baía de Paranaguá (Tabela V), onde, por exemplo, as concentrações de silicato são geralmente altas e não limitantes ao crescimento das diatomáceas.

Tabela V. Dados médios da concentração de nutrientes na Baía de Paranaguá.

	Si(OH) ₄	PO ₄	NO ₃	NO ₂
este estudo	102,59	0,75	13,1	1,42
Machado <i>et al.</i> (1999)	3,1 - 178	0,2 - 3	0,1 - 9	0 - 0,9
Knoppers <i>et al.</i> (1987)	1,5 - 140	0,07 - 1,4	0 - 13	0 - 0,3

Observou-se maior quantidade de nitrito no final dos tratamentos F/2 completo e com adição de nitrato (Tabela IV), podendo-se atribuir esse fenômeno a dois fatores principais: produção de nitrito pelas bactérias presentes nos meios de cultivo, ou, se o cultivo for considerado axênico, excreção de nitrito pelas próprias células (Parsons & Harrison, 1983; Raimbault, 1986; Aida *et al.*, 1991; Asano *et al.*, 1995). Este é um processo acoplado à absorção de nitrato que é reduzido a nitrito intracelularmente, pela ação da enzima nitrato-redutase (Raimbault, 1986; Aida *et al.*, 1991; Asano *et al.*, 1995). Por outro lado, quando as soluções de nitrato não são adicionadas ao meio de cultura, cessa rapidamente o nitrato da água do mar utilizada na preparação dos meios. Então, as células utilizam o nitrito como fonte alternativa de nitrogênio. Provavelmente por esta razão ocorreu a redução da concentração de nitrito nos outros três tratamentos.

No meio de cultura Guillard F/2 completo (Figura 02 - E) as fases de crescimento clássicas (v. Apêndice I.a) não tiveram diferenças tão conspícuas entre si, o que dificultou determiná-las.

5.d) Comparação entre as séries de experimentos

O crescimento celular do meio Guillard F/2 da série 01 foi mais rápido que o crescimento da série 02 (Figura 03). Observou-se 42,2 céls/ml, e 21,9 céls/ml para a primeira e segunda série, respectivamente, ambos no 8º dia. A série 02 só alcançou valores próximos (40,3 céls/ml) no 11º dia. Ou seja, a segunda série apresentou a fase inicial de crescimento mais longa do que a primeira, e atribui-se este comportamento à idade mais avançada da cultura, e às sucessivas repicagens da cultura "batch", que causam perda da qualidade das células (Stein, 1973).

Vários trabalhos enfatizam a importância do nitrato e fosfato no crescimento algal (Eppley *et al.*, 1969; Harrison *et al.*, 1976; Harrison *et al.*, 1977; Parsons & Harrison, 1983 e Thompson *et al.*, 1989). Entretanto, observou-se nos experimentos realizados neste trabalho que a adição de apenas um destes nutrientes não produziu crescimento semelhante nem próximo ao meio de cultura Guillard F/2 completo, onde os outros macro e micronutrientes estão em abundância. Estudos de fisiologia algal demonstraram que as células necessitam da interação entre macro, micronutrientes e outros fatores abióticos (luz e temperatura) para desenvolverem-se em cultivo (Reynolds, 1993).

5.e) Comparando *Coscinodiscus wailesii* com outras diatomáceas

A maioria das outras espécies de diatomáceas apresenta elevadas taxas de crescimento para células de pequenas dimensões, e baixas taxas de crescimento para células maiores (Werner, 1977; Fogg & Thake, 1987). No entanto, *Coscinodiscus wailesii* não segue este padrão, pois apresenta elevada taxa de crescimento e grandes dimensões, quando comparada às outras espécies (Tabela VI).

Tabela VI. Taxas de crescimento de diatomáceas marinhas cultivadas em diferentes condições de temperatura.

Espécie	μ	Temp. (° C)	tamanho (μ m)	Referência
<i>Asterionella formosa</i>	0,75	20		Lund (1949) **
<i>Asterionellopsis glacialis</i> (<i>Asterionella japonica</i>)	1,00	20	eixo apical 30-150	Kain & Fogg (1958) *
<i>Asterionella socialis</i>	1,20	18		Lewin & Mackas (1972)*
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (= <i>Nitzschia closterium</i>)	0,72	25		Spencer (1954) **
<i>Skeletonema costatum</i>	2,4	20	ϕ 3-20	Jitts <i>et al.</i> (1964)*
<i>Coscinodiscus pavillardii</i>	0,35	28	ϕ 90-300	Findlay (1972) **
<i>Coscinodiscus wailesii</i>	1,27	25	ϕ 230-350	este estudo
<i>Chaetoceros</i> sp.	1,81	29	-	Thomas (1966) **
<i>Chaetoceros armatum</i>	0,7	18		Lewin & Mackas (1972)*
<i>Dactylosolen fragilissimus</i> (= <i>Rhizosolenia fragilissima</i>)	1,2	10	ϕ 22-70 - comp. 530	Ignatiades & Smayda (1970)*
<i>Detonula confervacea</i>	1,5	20		Smayda (1969)*
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	2,5	20		Guillard & Ryther (1962)*

ϕ = diâmetro

* in Werner (1977)

** in Fogg & Thake (1987)

A taxa de crescimento algal é razoavelmente constante para uma determinada espécie. Este valor depende de uma variedade de fatores fisiológicos e metabólicos, mas geralmente o de maior importância é o tamanho da célula, considerando-se a relação superfície/volume e assim a taxa de crescimento da célula (Fogg & Thake, 1987). Geralmente, as espécies pequenas crescem mais rapidamente que as espécies grandes, as quais apresentam taxa de crescimento com valores baixos. Espécies grandes com alta taxa de crescimento podem estar associadas a grandes vacúolos existentes nestas células, onde o citoplasma fica com grande superfície de troca exposta ao meio externo. Isso favorece a fotossíntese e seu crescimento, quando comparadas com células pequenas, que apresentam vacúolos pequenos, e volume citoplasmático semelhante às grandes (Fogg & Thake, 1987).

A elevada constante de meia-saturação de nitrato (K_s) é outro item importante da fisiologia da *Coscinodiscus wailesii* (Tabela VII). Ela é maior do que a de muitas espécies, podendo ser determinante da elevada taxa de crescimento desta alga, o que também favoreceria a formação de florações.

Tabela VII. Constante de meia-saturação de nitrato ($K_s = \mu\text{g}$ de átomos/litro) para diatomáceas marinhas com diferentes dimensões (de Eppley *et al.*, 1969 in Werner, 1977).

Espécie	K_s	Tamanho (μm)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0,1-0,3	5	18
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	0,3-0,7	5	18
<i>Skeletonema costatum</i>	0,4-0,5	8	18
<i>Asterionellopsis glacialis</i> (= <i>Asterionella japonica</i>)	0,7-1,3	10	18
<i>Guinardia</i> (= <i>Rhizosolenia</i>) <i>stolterfothii</i>	1,7	20	18
<i>Leptocylindrus danicus</i>	1,2-1,3	21	18
<i>Ditylum brightwellii</i>	0,6	30	18
<i>Thalassiosira leptopus</i> (= <i>Coscinodiscus lineatus</i>)	2,4-2,8	50	18
<i>Rhizosolenia robusta</i>	2,5-3,5	85	18
<i>Coscinodiscus wailesii</i>	2,1-5,1	210	18

5.f) Observações taxonômicas

No presente trabalho detectamos a presença de uma roseta central tanto em populações naturais na Baía de Paranaguá quanto nas células cultivadas em laboratório.

A identificação confiável da espécie é muito importante, principalmente quando se trabalha com espécies produtoras de toxinas ou nocivas no plâncton. Os manuais publicados até o momento registram *C. wailesii* não possuindo roseta, além de uma série de características diagnósticas (Hasle & Lange, 1992; Hasle & Fryxell, 1995). Entretanto, neste trabalho encontramos indivíduos sem e com roseta central bastante desenvolvida. Isto diminuirá enganos na identificação desta espécie, com conseqüências quando ocorre em "blooms". Tais achados reforçam também a necessidade de maior precaução no momento de se identificar a espécie, uma vez que ela pode ser facilmente confundida com *Coscinodiscus concinnus* e *Coscinodiscus centralis*. A presença de roseta central a torna ainda mais próxima de *C. centralis*.

As dimensões da valva, o número de aréolas em $10 \mu\text{m}$, o padrão de distribuição das aréolas e, a partir de nossos estudos, a presença de roseta com aréolas maiores alongadas na área central da valva, são caracteres que se sobrepõem nas três espécies mencionadas. Adicionalmente, as macrorimopórtulas das três espécies são semelhantes, quando observadas em MEV. Por outro lado,

algumas características facilmente visualizadas em MO permitem diferenciá-las entre si (Hasle & Lange, 1992; Hasle & Fryxell, 1995). A superfície valvar de *C. wailesii* é plana e o manto está em ângulo reto, enquanto em *C. concinnus* e *C. centralis* a valva é convexa. A região marginal da valva de *C. wailesii* apresenta dois anéis de rimopórtulas, uma no limite entre o manto e a superfície, e outra na margem do manto. Nas outras duas espécies há somente um anel, localizado na borda do manto. Várias pequenas rimopórtulas também ocorrem espalhadas na superfície da valva de *C. wailesii*, inexistentes em *C. concinnus* e *C. centralis*.

A espécie foi registrada pela primeira vez no Brasil por Valente-Moreira (1987), mas este autor não forneceu medidas ou fotografias, tornando difícil qualquer comparação ou confirmação da sua identidade. Na mesma amostra este autor também encontrou *C. concinnus* e *C. centralis*, espécies bastante próximas. Na Baía de Paranaguá a espécie vem sendo registrada desde 1991 em todos os meses, e ocorrendo esporadicamente na forma de florações (Fernandes, 1992; observações pessoais). Nestas ocasiões suas densidades chegaram a $10,0 \times 10^4$ - $20,0 \times 10^4$ céls/l. Souza-Mosimann *et al.* (1993) também a observaram no litoral de Santa Catarina, em áreas próximas a estuários.

6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para comparar os efeitos conjuntos de nitrato e fosfato, sugere-se realizar um experimento utilizando meio indefinido mais a adição de solução estoque de nitrato e fosfato conjuntamente, e eventualmente também de silicato.

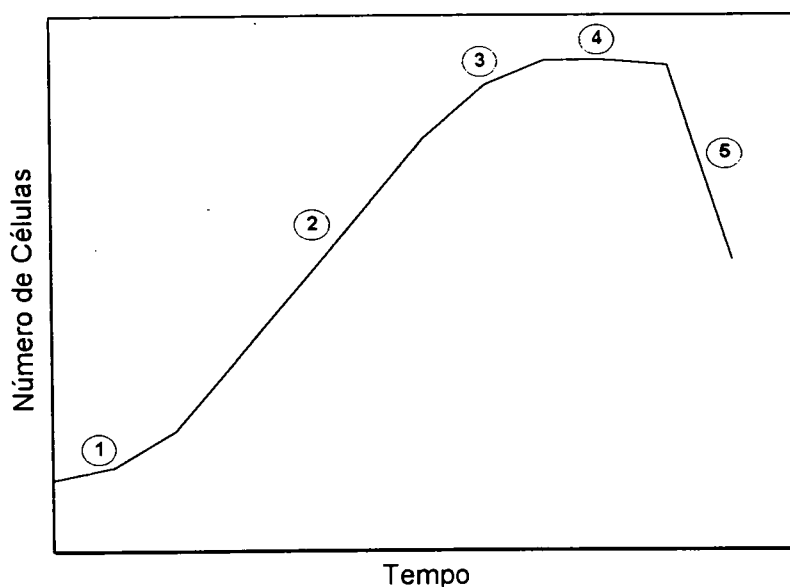
Para avaliar seu potencial ótimo de crescimento na Baía de Paranaguá, Paraná, sugere-se realizar experimentos com diferentes condições de temperatura, salinidade e nutrientes (nitrato, fosfato e silicato).

Sugere-se utilizar um maior volume de meio de cultura (2 - 3 litros) de modo a facilitar a obtenção de sub-amostras para diferentes procedimentos laboratoriais (análise de nutrientes, análise de clorofila e contagem de células). Há necessidade de obter-se dados de nutrientes em réplicas e a cada 24 horas de experimento, para aprofundar a discussão dos resultados obtidos.

Apêndice I

a- Fases do cultivo tipo “batch” ou estanque

No cultivo tipo “batch” o aumento do número de células segue um curso característico no qual as seguintes fases são normalmente reconhecidas (v. Gráfico): (1) fase de indução ou lag; não há nenhum aumento aparente em números de células; (2) fase exponencial ou log; ocorre multiplicação rápida das células aumentando em progressão geométrica; (3) fase de declínio, onde o crescimento é relativo; (4) fase estacionária; o número de células permanece constante; e (5) fase de morte. Às vezes uma ou mais destas fases podem ser reduzidas, sendo assim raramente reconhecidas (Fogg & Thake, 1987).



Compilado de Fogg & Thake, 1987.

b- Necessidades nutricionais das microalgas

Compilado de Eppley *et al.*, 1969; Fogg & Thake, 1987; Reynolds, 1993; Paranhos, 1996.

O sucesso dos métodos utilizados para obtenção de culturas algais depende diretamente das informações obtidas sobre as necessidades nutricionais das algas (Reynolds, 1993). Para o crescimento bioquímico normal das microalgas há a necessidade de um variado número de elementos minerais, que estão divididos em

dois grandes grupos: os *macronutrientes* (C, H, O, N, P, S, K, Mg) utilizados direta ou indiretamente para as estruturas celulares; e os *micronutrientes* (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, V, B, Cl, Co, Ca, Si, Na) necessários em concentrações pequenas para catálises, estruturação do material celular e regulação osmótica. Baseando-se nisto foram formulados inúmeros meios de cultura, que procuram suprir as necessidades fisiológicas das espécies em condições de cultivo (Reynolds, 1993).

Fonte e utilização de alguns macronutrientes:

NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes para o crescimento de microalgas, e em praticamente todos os meios de cultura está em maior concentração (Lourenço, 1996). Ele é utilizado nos processos de síntese e acumulação de aminoácidos e proteínas, que constituem aproximadamente um oitavo a um sexto do total destes compostos; o conteúdo mínimo de nitrogênio na célula é de 3 a 4 % do peso seco da célula (Reynolds, 1993).

A fonte orgânica do nitrogênio é o ácido úrico, uréia e outros compostos orgânicos dissolvidos como aminoácidos e peptídeos livres. Entretanto, a fonte inorgânica é mais importante na regulação do crescimento do fitoplâncton, ocorrendo principalmente nas formas de nitrato, nitrito e amônia (Dugdale, 1976; Reynolds, 1993).

O íon nitrito (NO_2^-) é base conjugada do ácido nitroso (HNO_2), que é um ácido fraco e existe somente em soluções aquosas diluídas, pois ele se decompõe rapidamente formando água, trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) ou ácido nítrico, óxido nítrico (NO) e água. Os sais do ácido nitroso (nitritos) são muito mais estáveis que o próprio ácido, sendo facilmente solúveis em água. O nitrito ocorre na água como um composto intermediário e menos estável na redução microbiana; ele pode ser excretado pelo fitoplâncton, especialmente durante períodos de abundante nutrição (Paranhos, 1996).

O íon nitrato (NO_3^-) é a base conjugada do ácido nítrico (HNO_3), que é forte e dissocia-se na água produzindo íons nitrato e hidroxônio (H_3O^+). (Who, 1974 in Paranhos, 1996). Os sais de ácido nítrico (nitratos) são facilmente solúveis em

água. O nitrato é o produto final da oxidação dos compostos nitrogenados na água, sendo considerado o único nível de oxidação termodinamicamente estável na presença do oxigênio da água do mar. Em muitas áreas marinhas, o nitrato pode ser considerado como o nutriente limitante da produção primária na zona eufótica (Eppley *et al.*, 1969; Paranhos, 1996).

FÓSFORO

O fósforo é um elemento constituinte fundamental da matéria viva. Ele é componente importante do ATP (adenosina trifosfato), dos ácidos nucleicos e é a base da síntese enzimática e do sistema intracelular de transferência de energia e dos lipídeos fosfatados. É essencial também no metabolismo e crescimento do fitoplâncton, podendo em muitos casos ser considerado como nutriente limitante da produtividade primária. Na água, o fósforo ocorre normalmente em estados oxidados, ou em íons inorgânicos ortofosfatados (HPO_4 , H_2PO_4) ou em compostos orgânicos biogênicos (Eppley *et al.*, 1969; Reynolds, 1993; Paranhos, 1996).

SÍLICA

A sílica é utilizada pelo fitoplâncton em pequenas quantidades na síntese de proteínas e carboidratos. O silício tem um ciclo similar aos ciclos do nitrogênio e do fósforo, podendo ser considerado um elemento nutriente, pois é absorvido pelas diatomáceas para depositá-lo nas frústulas. E estas constituem a parede celular, composta por polímeros de sílica. O silício é o sexto elemento mais abundante na crosta terrestre, que aparece como óxido em quartzos e areias e combinado com metais na forma de muitos complexos silicato-minerais, principalmente em rochas ígneas. Na água a sílica ocorre em suspensão (no estado de colóides e de polímeros), em ácidos sílicos ou em íons silicatos (SiO_2) (Reynolds, 1993; Paranhos, 1996).

Apêndice II

Composição do meio de cultura semi-definido Guillard F/2 (Guillard, 1975) .

1. Ingredientes

Nitrato (solução estoque)	1 ml
Fosfato (solução estoque)	1 ml
Silicato (solução estoque)	1 ml
Metais traços (solução estoque)	1 ml
Vitaminas (solução estoque)	1 ml
Água do mar	1000 ml

2. Solução estoque em água destilada

NaNO ₃	7,5 g / 100 ml
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	0,5 g / 100 ml
Na ₂ SiO ₃ . 9H ₂ O	3,0 g / 100 ml

Metais traços:

CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,98 g / 100 ml
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,2 g / 100 ml
CoCl ₂ . 6H ₂ O	1,05 g / 100 ml
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,0 g / 100 ml
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,63 g / 100 ml

* As soluções devem ser preparadas separadamente. Em seguida, dissolver:

Fe-Sequestreno 5 g / 900 ml

* Adicionar a esta última solução 1 ml de cada uma das soluções estoque primárias de metais traços acima e acertar o volume final para 1 litro. O pH desta solução é de 4,5.

A solução estoque de Fe-Sequestreno pode ser substituída pela solução de:

FeCl ₃ . 6H ₂ O	3,15 g / 900 ml
Na ₂ EDTA	4,36 g / 900 ml

* Adicionar 1 ml de cada solução estoque primária dos metais traços acima e acertar o volume para 1 litro. O pH final é $\pm 2,0$ e a solução é transparente. A adição de 1ml desta solução ao meio de cultura não acarreta variação significativa no pH do meio.

Vitaminas:

Tiamina	10 mg / 100 ml
Biotina	0,1 mg / 100 ml
Vitamina B ₁₂	0,1 ml / 100 ml

Manter as soluções estoque em geladeira, e a solução de vitaminas no congelador.

O pH final do meio, após a sua preparação, deve ser ajustado para 8,0 - 8,2 com soluções autoclavadas de NaOH (1N) ou HCl (1N).

Apêndice III

Esterilização de vidrarias

As vidrarias utilizadas na preparação das soluções-estoque dos meios de cultura, manutenção das culturas e execução dos experimentos foram esterilizadas seguindo o protocolo apresentado em CETESB (1986). Assim, foram lavadas com detergente neutro, enxaguadas 7 vezes com água de torneira, deixadas no ácido clorídrico (10%) por um período de 12 horas, novamente enxaguadas 7 vezes com água de torneira e 3 vezes com água destilada. Em seguida, foram secadas em estufa à 100°C por 3 horas, autoclavadas e secadas novamente em estufa à 100°C por 3 horas, e colocadas na capela sob radiação ultra-violeta por 2 horas. Os meios de cultura preparados nestes experimentos também foram autoclavados (vapor saturado a 1 atm e 121°C por 15' a 30') e colocados na capela sob radiação ultra-violeta por 2 horas, para posteriormente serem utilizados.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDAR, E.; EHRLICH, R.; ASANO, C.S. & SIGAUD, T.C.S. - 1991. Variação da composição química do meio de cultura e da bioquímica celular de *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin), em cultivos estanques. **Boletim Instituto Oceanográfico**, São Paulo. 39(2):131-139.
- ASANO, C.S.; COLEPICOLO, P. & AIDAR, E. - 1995. Nitrate reductase activity in the diatom *Biddulphia longicruris*: characterization and daily oscillation. **Boletim Instituto Oceanográfico**, São Paulo. 43(2):123-128.
- BRANDINI, F.P.; LOPES, R. M.; GUTSEIT, K.S.; SPACH, H.L. & SASSI, R. - 1997. **Planctonologia na Plataforma Continental do Brasil - Diagnose e Revisão Bibliográfica**. Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal - IBAMA/CIRM/FEMAR, 196p.
- CETESB - 1986. **Lavagem de materiais utilizados em ensaios biológicos**. São Paulo: 1-14.
- CUPP, E.E. - 1943. **Marine Plankton Diatoms of the West Coast of North America**. Los Angeles. 237p.
- DUGDALE, R.C. - 1976. Nutrient cycles. *In: The ecology of the seas* (CUSHING, D.H.C.; WALSH, S.S. eds.), Blackwell Scientific Publ., Philadelphia. : 141-172.
- ENEVOLDSEN, H.O. - 1995. Agencies and addresses: international and regional organisations with programmes or activities on harmful microalgae. *In: Intergovernmental Oceanographic commission. Manual on Harmful Marine Microalgae*. Unesco, : 533-543.
- EPPLEY, R.W. & THOMAS, W.H. - 1969. Comparison of half-saturation constants for growth and nitrate uptake of marine phytoplankton. **Journal of Phycology**, 5: 375-379.
- FERNANDES, L.F. - 1992. **Variação sazonal do fitoplâncton e parâmetros hidrográficos em uma estação costeira de Paranaguá, Paraná, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-graduação em Botânica, UFPR, Curitiba, 93p.
- FOGG, G.E. & THAKE, B. - 1987. **Algal Cultures and Phytoplankton Ecology**. University of Wisconsin Press, third edition, 269p.
- GUILLARD, R.R.L. - 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *In: SMITH, W.L. & CHANLEY, M.H. (eds.) 1975. Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, : 29-60.

- HALLEGRAEFF, G.M. - 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. **Phycologia**, 32(2): 79-99.
- HALLEGRAEFF, G.M. - 1995. Harmful algal blooms: A global overview. In: Intergovernmental Oceanographic Commission. **Manual on Harmful Marine Microalgae**. UNESCO, p.1-22.
- HARRISON, P.J.; CONWAY, H.L. & DUGDALE, R.C. - 1976. Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. I. Cellular chemical composition and steady-state growth kinetics of *Skeletonema costatum*. **Marine Biology**, 35: 177-186.
- HARRISON, P.J.; CONWAY, H.L.; HOLMES, R.W. & DAVIS C.O. - 1977. Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. III. Cellular chemical composition and morphology of *Chaetoceros debilis*, *Skeletonema costatum*, and *Thalassiosira gravida*. **Marine Biology**, 43: 19-31.
- HASLE, G.R. & FRYXELL, G.A. - 1970. **Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscope**. Transactions of American Microscopical Society, 89(4): 469-474.
- HASLE, G.R. & LANGE, C.B. - 1992. Morphology and distribution of *Coscinodiscus* species from the Oslofjord, Norway, and the Skagerrak, North Atlantic. **Diatom Research**, 7(1): 37-68.
- HASLE, G.R. & FRYXELL, G.A. - 1995. Taxonomy of diatoms. In: Intergovernmental Oceanographic Commission. **Manual on Harmful Marine Microalgae**. UNESCO, :339-364.
- HASLE, G.R. & SYVERTSEN, E.E. - 1996. Marine Diatoms (Chapter 2). In: TOMAS, C.R. - 1996. **Identifying Marine Phytoplankton**, Florida.
- KNOPPERS, B.A.; BRANDINI, F.P. & THAMM, C.A. - 1987. Ecological studies in the Bay of Parangará. II. Some physical and chemical characteristics. **Nerítica**, 2(1): 1-36.
- LANGE, C.B.; HASLE, G.R. & SYVERTSEN, E.E. - 1992. Seasonal cycle of diatoms in the Skagerrak, North Atlantic, with emphasis on the period 1980-1990. **Sarsia**, 77: 173-187.
- LEGENDRE, L. - 1990. The significance of microalgal blooms for fisheries and for the export of particulate organic carbon in oceans. **Journal of Plankton Research**, 12(4): 681-699.

- LOURENÇO, S.O. - 1996. **Variação da composição bioquímica de microalgas marinhas em cultivos, com ênfase nos efeitos da disponibilidade do elemento nitrogênio.** Tese de Doutorado, Curso de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, USP, São Paulo, 163p.
- MACHADO, E.C.; DANIEL, C.B.; BRANDINI, N. & QUEIROZ, R.L.V. - 1999. Temporal and spatial dynamics of nutrients and particulate suspended matter in Paranaguá Bay, PR, Brazil. **Nerítica**, 11 (no prelo).
- MOREIRA FILHO, H.; VALENTE-MOREIRA, I.M.; SOUZA-MOSIMANN, R.M. & CUNHA, J.A. - 1990. Avaliação florística e ecológica das diatomáceas (Chrysophyta, Bacillariophyceae) marinha e estuarinas nos estados do Paraná, Santa Catarina. **Estudos de Biologia**, Pontifícia Univ. Católica do Paraná, 25: 5-48.
- MORRIS, I. - 1980. **The physiological ecology of phytoplankton.** Oxford: Blackwell.
- NAGAI, S. & MANABE, T. - 1993. Auxospore formation of a giant diatom, *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae), in culture. **Bulletin of Plankton Society of Japan**, 40(2): 151-167.
- NAGAI, S.; HORI, Y.; MANABE, T. & IMAI, I. - 1994. Promotion of sperm formation of giant diatom *Coscinodiscus wailesii* Gran by a marine bacterium. **Fisheries Science**, 60(5): 625-626.
- NAGAI, S.; HORI, Y.; MANABE, T. & IMAI, I. - 1995. Morphology and rejuvenation of *Coscinodiscus wailesii* Gran (Bacillariophyceae) resting cells found in bottom sediments of Harina-Nada, Seto Island Sea, Japan. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 61(2): 179-185.
- NAGAI, S.; HORI, Y.; MANABE, T. & IMAI, I. - 1995a. Restoration of cell size by vegetative cell enlargement in *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae). **Phycologia**, 34(6): 533-535.
- NAGAI, S.; HORI, Y.; MIZUTAKA, K.; MANABE, T. & IMAI, I. - 1996. Population dynamics of *Coscinodiscus wailesii* Gran (Bacillariophyceae) in Harina-Nada, Seto Island Sea, Japan. **Harmful and Toxic Algal Blooms**. Unesco.
- NAGAI, S. & IMAI, I. - 1997. The effect of irradiance and irradiation time on the size of initial cells in vegetative cell enlargement of *Coscinodiscus wailesii* (Centrales, Bacillariophyceae) in culture. **Phycological Research**, 45: 117-121.
- NEHRING, S. - 1998. Non-indigenous phytoplankton species in the North Sea: supposed region of origin and possible transport vector. **Arch. Fish. Mar. Res.**, 46(3): 181-194.

- PARANHOS, R. - 1996. **Alguns Métodos para Análise da Água**. Cadernos didáticos da UFRJ, Sub-Reitoria de Ensino de Graduação e Corpo Discente/SR. Rio de Janeiro. 200p.
- PARSONS, T.R. & HARRISON, P.J. - 1983. Nutrient cycling in marine ecosystems. **Encyclopedia of plant physiology. Physiological plant ecology IV**. Springer, Verlag, New York, : 77-95.
- RAIMBAULT, P. - 1986. Effect of temperature on nitrite excretion by three marine diatoms during nitrate uptake. **Marine Biology**, 92(2): 149-155.
- REYNOLDS, C.S. - 1993. **The ecology of freshwater phytoplankton**. University of Cambridge, 334p.
- RICK, H.J. & DÜRSELEN, C.D. - 1995. **Importance and abundance of the recently established species *Coscinodiscus wailesii* Gran & Angst in the German Bight**. Biologische Anstalt Helgoland, 49: 355-374.
- RINCÉ, Y. & PAULMIER, G. - 1986. Données nouvelles sur la distribution de la diatomée marine *Coscinodiscus wailesii* Gran & Angst (Bacillariophyceae). **Phycologia**, 25(1): 73-79.
- ROSS, R.; COX, E.J.; KARAYEVA, N.I.; MANN, D.G.; PADDOCK, T.B.B.; SIMONSEN, R. & SIMS, P.A. - 1979. **An amended terminology for the siliceous components of the diatom cell**. Nova Hedwigia, Beih., 64: 513-533.
- ROUND, F.E.; CRAWFORD, R.M. & MANN, D.G. - 1990. **The diatoms. Biology and morphology of the genera**. Cambridge University Press, Cambridge, 747p.
- SCOR-UNESCO - 1966. Determination of photosynthetic pigments. *In*: **UNESCO, monographs on oceanographic methodology**. 1:9-18.
- SCHMID, A.M. & VOLCANI, B.E. - 1983. Wall morphogenesis in *Coscinodiscus wailesii* Gran and Angst. **Journal of Phycology**, 19: 387-402.
- SMAYDA, T. J. - 1997. Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. **Limnology Oceanography**, 42 (5, part 2): 1137-1153.
- SOUZA-MOSIMANN, R.M. de; FELÍCIO-FERNANDES, G.; SILVA, R.L. & FERNANDES, L.F. - 1993. Diatomáceas no trato digestivo de três espécies de camarão da pesca artesanal marinha - Santa Catarina, Brasil. **Insula**, 22: 83-106.

- STEEMANN-NIELSEN, E. - 1978. Principal aspects concerning the batch technique in algal assays. **Mitt. int. Verein. Theor. angew. Limnol.**, 21:81-87.
- STEIN, J.R. - 1973. **Handbook of Phycological Methods Culture Methods and Growth Measurements**. Cambridge. 448p.
- STRICKLAND, J.D. H. & PARSONS, T.R. - 1972. A handbook of seawater analysis. **Fisheries Research Board of Canada**, Bulletin 167, 2nd ed, 310 p.
- THOMPSON, P.A.; LEVASSEUR, M.E. & HARRISON, P.J. - 1989. Light-limited growth on ammonium vs. nitrate: What is the advantage for marine phytoplankton? **Limnol. Oceanogr.**, 34(6): 1014-1024.
- VALENTE-MOREIRA, I.M. - 1987. A flórmula diatomológica marinha e estuarina nos balneários de Canoas e Ipanema. Estado do Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia**, Pontifícia Univ. Católica do Paraná, 17: 26-48.
- WERNER, D. - 1977. The biology of diatoms. **Botanical Monographs**, 13. Los Angeles, California. : 29-51.